

膜移植が下歯槽神経の再生に有用であるか検索することを目的に形態学的な変化を観察した。

【材料及び方法】10週齢以上のオス Wistar 系ラットを使用し、ラット鼻腔よりジエチルエーテル麻酔下に嗅粘膜を採取した。下歯槽神経損傷ラットは顎下部よりオトガイ神経を明示してメスで切断後、直径 2 mm のラウンドバーで半球状にオトガイ孔を拡大して移植床を形成した。移植群は移植床に嗅粘膜を移植して、非移植群では移植せずに閉鎖した。処置後 3, 5, 7, 14, 21, 28 日目に下顎骨を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液で 24 時間固定後、EDTA 液で 4 週間脱灰を行った。標本はパラフィン包埋して 4 μ m の切片を作製し、組織学的および免疫組織学的に観察した。

【結果】非移植群では 5 日目より移植床および下顎管内に骨添加を認め、経時的に増加して 28 日目の下顎管内には添加骨の間隙に S100 陽性細胞と NFP 陽性線維をわずかに認めた。移植群では 28 日目まで移植床および下顎管の形態は保たれ、3 ~ 5 日目の移植床内に p75 陽性の嗅神経鞘細胞が S100 陽性の Schwann 細胞周囲に認められた。7 日目には嗅神経鞘細胞は線状となり S100 陽性細胞の形状と一致し、14 日目以降は下歯槽神経の切断面から移植床にかけて S100 陽性細胞と NFP 陽性線維を認めた。以上のことから、下歯槽神経損傷部への嗅粘膜移植は、嗅粘膜に含まれる嗅神経鞘細胞や Schwann 細胞あるいは幹細胞が神経を伸長させる環境を形成するため、損傷後の神経再生に有用であることが示唆された。

7) 環境培養 pH がおよぼす骨芽細胞のサイトカイン産生についての研究

○黒田 栄子¹, 廣瀬 公治², 佐藤 直生³, 福井 和徳⁴
(奥羽大・歯・附属病院¹, 奥羽大・歯・口腔衛生²
奥羽大・大学院・顎顔面口腔矯正³
奥羽大・歯・成長発育歯⁴)

【目的】矯正治療では装置装着により口腔内の環境が大きく変化し、歯肉炎などの歯周疾患の発症が認められる。Bickel らによると歯周疾患局所においては、その環境 pH がアルカリ性に推移することが示されている。この環境 pH がおよぼす歯周組織への影響、とりわけ骨改造に重要な役

割を果たしている骨芽細胞における検討は未だ少ない。そこで今回、ヒト骨芽細胞様骨肉腫細胞を用いストレスの要因のひとつである培養環境 pH の影響を検討したので報告した。

【材料および方法】ヒト骨肉腫細胞（以下 SaOS₂）を使用し、培養培地は pH7.0 から 7.8 に調整した 50mM-HEPES 緩衝 D-MEM を使用した。Transforming growth factor- β 1（以下 TGF- β 1）と Interleukin-11（以下 IL-11）の mRNA の発現をリアルタイム PCR で解析した。培養上清中の TGF- β 1 の産生量を ELISA により求めた。

【結果】SaOS₂ は培養環境 pH の上昇に伴い TGF- β 1 の産生が促進され、それと同時に骨吸収促進サイトカインである IL-11 の産生が誘導された。そしてこの IL-11 の産生促進は抗 TGF- β 1 抗体により阻害された。

【考察】培養環境 pH の上昇は SaOS₂ からの TGF- β 1 産生を一時的に促進し、それと同時に骨吸収を促進する IL-11 の産生が認められた。さらに、この IL-11 の産生促進は抗 TGF- β 1 抗体により阻害された。このことは、骨芽細胞に対する pH ストレスが骨のリモデリングに影響を与えている可能性を示す。

今回の研究で、骨芽細胞に対する弱アルカリの環境ストレスは、骨代謝に重要な役割を果たす TGF- β 1 の産生を促進する一方、オートクリンの系を介し骨吸収因子である IL-11 の産生を促進するというネガティブフィードバックの存在を明らかにした。

【結論】SaOS₂ の産生した TGF- β 1 はオートクリンの系を介し IL-11 の産生を促進した。

8) 骨細胞の分離培養法の確立

○佐藤真理子
(奥羽大・歯・歯科保存)

【研究目的】近年、力（メカニカルフォース）によって骨代謝がコントロールされるという Wolff の法則や Frost の理論が注目され、骨再生治療にメカニカルフォースを利用する方法が確立されてきている。骨組織において、このメカニカルフォースを認識する細胞は骨細胞であることが、基礎的

な研究から明確になり、骨細胞の機能が注目されている。しかし、骨細胞の培養法についての報告はいくつかあるが、骨細胞としての機能を検索している報告はほとんど見られないのが現状である。このような背景から本研究は、骨再生療法の発展に寄与すべく、骨細胞の機能を分析するために、骨組織から骨細胞を分離培養する方法を確立することを目的とした。

【材料と方法】動物は2日齢の新生SDラットを使用し、頭蓋骨を摘出し、骨細胞を分離した。骨細胞の分離法はコラゲナーゼの酵素液とEDTAの脱灰液を交互に処理する方法を用いた。対照実験のために、ラット骨肉腫から分離された骨芽細胞株であるROS細胞を使用した。細胞の培養法は、10%牛血清を含んだ α -MEMを用いて5%CO₂環境の下、7日間の培養を行った。培養後の骨細胞のphenotypeの検索にはAlikaline phosphatase(ALP)染色、抗Sclerostin抗体、抗DMP-1抗体を用いた免疫組織化学的染色、real time PCRを用いたALP、Sclerostin、type I collagen、DMP-1、Osteocalcin、Osteopontin、PTH/PTHrP receptorのmRNA発現を調べ、骨芽細胞と比較検討した。

【結果と考察】培養7日目の細胞のALP染色では、細胞の集団の中に細胞突起を有したALP陰性の細胞が認められた。これら細胞には免疫組織化学的染色法により、骨細胞の特異的マーカーであるSclerostin、DMP-1の局在が認められた。Real time PCRの結果では、骨芽細胞の代表的な遺伝子発現として知られるALPとType I collagen mRNAの発現については、骨芽細胞の発現に比較して骨細胞様細胞での発現は約1/10だった。一方、骨細胞に特有に発現するSclerostinとDMP-1のmRNA発現では骨芽細胞の発現に比較して骨細胞様細胞での発現は約10倍だった。Osteocalcin、ostopontin、PTH/PTHrP receptorのmRNA発現は骨芽細胞および骨細胞様細胞の両者で同様に認められた。

以上の結果から骨組織から分離した細胞は、骨細胞特有の細胞突起を有する形態を示し、骨細胞特有の遺伝子発現を示した。

【結 論】本実験で確立した細胞分離方法は、骨

細胞を研究する上で有用な方法であることが示された。

9) ヒト歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカイン産生に対するamphotericin Bの修飾作用

○小林 良誌¹, 玉井利代子^{1,2}, 清浦 有祐^{1,2}

(奥羽大・大学院・口腔感染症¹

奥羽大・歯・口腔病態解析制御²)

【目 的】抗真菌薬であるamphotericin B(AmB)は真菌に対して直接の殺菌作用を示すだけでなく、宿主の免疫担当細胞の免疫機能を亢進させる作用を持つことが報告されている。免疫機能の亢進は時には、宿主に傷害作用をもたらす場合がある。本研究では、口腔常在細菌であるFusobacterium nucleatum (F. nucleatum)に対するヒト歯肉線維芽細胞の宿主応答に及ぼすAmBの影響を炎症性サイトカインの産生を中心にして明らかにすることを試みた。

【材料と方法】ヒト歯肉線維芽細胞は、96 wellマイクロプレートを使用して培養した。任意の濃度に調整したAmB溶液とF. nucleatum菌液を線維芽細胞に加えて、37℃条件下で24時間培養した。培養終了後に培養上清中のサイトカイン含有量をヒトELISAキットを使用して測定した。

【結 果】1. AmBおよびF. nucleatumによるIL-6産生誘導作用

2.5 μ g/mlの濃度のAmBをF. nucleatumと同時に加えた場合は、F. nucleatum単独よりもIL-6の産生が有意に増強した。

2. AmBおよびF. nucleatumによるIL-8産生誘導作用

IL-8もIL-6と同様に2.5 μ g/mlの濃度のAmBをF. nucleatumと共に加えた場合に、IL-8の産生がF. nucleatum単独よりも有意に増加した。

3. F. nucleatumによるMCP-1産生誘導に対するAmBの抑制作用

2.5 μ g/ml濃度のAmBをF. nucleatumと同時に添加した場合は、F. nucleatum単独よりもMCP-1の産生が有意に抑制された。

以上のことから、AmBはIL-6やIL-8の場合とは異なり、歯肉線維芽細胞からのMCP-1の産